

Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 08183740
PUBLICATION DATE : 16-07-96

APPLICATION DATE : 28-12-94
APPLICATION NUMBER : 06327159

APPLICANT : NIPPON STEEL CHEM CO LTD;

INVENTOR : SATO YOSHIMI;

INT.CL. : A61K 38/00 A61K 38/00 // C07K 7/06

TITLE : CELL-ANCHORING INHIBITOR AND ANTI-INFLAMMATORY CONTAINING THE SAME

ABSTRACT : PURPOSE: To provide an anti-inflammatory agent which is very useful in industry because it is of very low toxicity and can remedy a very wide range of inflammatory diseases to which various kinds of leukocytes participate.

CONSTITUTION: This cell-anchoring inhibitor contains, as an active ingredient, a peptide of the general formula: A-Ser-Arg-Gly-Asp-Trp-OH (A is selected from the group consisting of orotic acid, hydro-orotic acid, pyroglutamic acid, L-2-azetidinic carboxylic acid, proline, 3,4-dehydropoline and sarcosine) and its pharmaceutically permissible salts. An anti-inflammatory agent containing this anchoring inhibitor.

COPYRIGHT: (C)1996,JPO

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-183740

(43) 公開日 平成8年(1996)7月16日

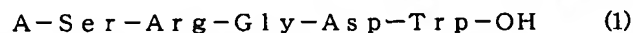
(51) Int.Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 38/00	ADS			
	ABE			
// C 0 7 K 7/06	ZNA	8318-4H		
			A 6 1 K 37/ 02	ADS
				ABE
			審査請求 未請求	請求項の数2 OL (全 7 頁)

(21) 出願番号	特願平6-327159	(71) 出願人	000006655 新日本製鐵株式会社 東京都千代田区大手町2丁目6番3号
(22) 出願日	平成6年(1994)12月28日	(71) 出願人	000006644 新日鐵化学株式会社 東京都中央区新川二丁目31番1号
		(72) 発明者	片田 淳 神奈川県川崎市中原区井田1618 新日本製 鐵株式会社先端技術研究所ライフサイエン ス研究センター内
		(74) 代理人	弁理士 平木 祐輔 (外1名)
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞接着阻害剤及び該阻害剤を含む抗炎症剤

(57) 【要約】

* * 【構成】 下記一般式(1) :



(式中、Aはオロチン酸、ヒドロオロチン酸、ピログルタミン酸、L-2-アゼチジンカルボン酸、プロリン、3、4-デヒドロプロリン及びサルコシンからなる群から選ばれる化合物を示す) で表されるペプチドまたはその薬学的に許容される塩を有効成分として含有す

る、細胞接着阻害剤。該細胞接着阻害剤を主成分として含有する抗炎症剤。

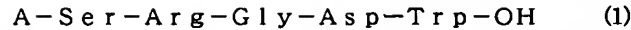
【効果】 極めて低毒性であり、また様々な白血球細胞の関与する幅広い炎症性疾患に対する治療を可能にするという点で、産業上極めて有用である。

1

2

【特許請求の範囲】

* * 【請求項1】 下記一般式(1)：



(式中、Aはオロチン酸、ヒドロオロチン酸、ピログルタミン酸、L-2-アゼチジンカルボン酸、プロリン、3、4-デヒドロプロリン及びサルコシンからなる群から選ばれる化合物を示す)で表されるペプチドまたはその薬学的に許容される塩を有効成分として含有する、細胞接着阻害剤。

【請求項2】 請求項1に記載の細胞接着阻害剤を有効成分として含有する抗炎症剤。

【発明の詳細な説明】

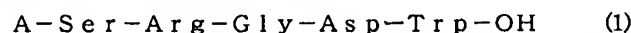
【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、細胞接着阻害剤及び炎症の際の白血球の活性化および白血球の血管外への遊走を抑制することにより炎症反応の進行を抑制する新規抗炎症剤に関する。

【0002】

【従来の技術】炎症反応は、生体防御機構として本来身体に備わっている免疫系が外的や外来性の物質に対し、過剰に反応した状態である。細菌や様々な化学物質が体内に入ると、細菌由来の物質や化学物質そのものに反応した血液中の白血球が血管外に出て(この現象を白血球の血管外への遊走と呼ぶ)、感染箇所集まる。これらの遊走白血球は血管外へ出ると同時に活性化を受け、サイトカインと呼ばれる一連の化合物や多くの炎症性の物質(プロスタグランジン、ロイコトリエン、血小板活性化因子など)を産生・放出するようになる。これらの物質が更に他の様々な免疫に関与する細胞を活性化したり、呼び寄せたりすることにより外敵を排除するわけであるが、この反応が過剰に進むと、痛み・腫れ・発熱などのいわゆる炎症反応が引き起こされる。

【0003】炎症反応の最初の段階である白血球の血管外への遊走は、数段階に及ぶ複雑な現象であり、この過程には白血球と血管内皮細胞との接着や白血球と血管基底膜との接着など様々な細胞接着が関係している。血流に乗って流れている白血球は、起炎物質により活性化された血管内皮細胞が表面に発現させた白血球受容体に結合することで、炎症部位付近の内皮細胞と接着する。次に、一度接着した白血球は内皮細胞表面の別の白血球受容体を利用して、内皮細胞との接着を保ちながら伸展し、更に内皮細胞の隙間から血管外へと移動する。遊走した白血球は次に内皮細胞下の基底膜と接着し基底膜を足場にして更に外へと移動し、炎症部位へと到達する。この白血球の血管基底膜への接着は、基底膜を構成するコラーゲン、フィブロネクチン、ピロネクチン、ラミ※



(式中、Aはオロチン酸、ヒドロオロチン酸、ピログルタミン酸、L-2-アゼチジンカルボン酸、プロリン、3、4-デヒドロプロリン及びサルコシンからなる群から選ばれる化合物を示す)で表されるペプチドまた

※ニ等のいわゆる細胞外基質タンパク質と白血球表面に存在するインテグリンと呼ばれる受容体との相互作用を介して行われる。

【0004】現在臨床的に使用されている抗炎症剤と呼ばれるもののほとんどは、これらのステップのうち、活性化された遊走白血球の機能を抑えたり、炎症部位周辺の細胞によるサイトカインやその他の炎症性物質の合成を阻害する物質である。特に炎症性物質産生における最重要酵素であるシクロオキシゲナーゼの阻害剤は、抗炎症薬として広く用いられている。しかし、これらの抗炎症薬は、炎症の種類によっては必ずしも有効ではないことが多く、また作用メカニズム的に胃の粘膜障害(胃潰瘍を生じさせる)や腎障害等の重大な副作用が不可避であり、より副作用の小さくかつ広範な炎症に対する有効性を有した化合物が望まれている。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、新規細胞接着阻害剤、及び当該細胞接着阻害活性を利用した広範な炎症性疾患に対して有効でありかつ副作用の小さい新規抗炎症剤を提供することにある。

【0006】

【課題を解決するための手段】副作用が少なく、より効果的な抗炎症剤を開発するためには、従来のシクロオキシゲナーゼ阻害剤に代表される抗炎症剤とは異なり、炎症反応の初期段階を特異的に抑制する必要がある。即ち、活性化された遊走白血球の機能を抑えるのではなく、白血球の遊走や活性化そのものを抑えることが有効である。

【0007】近年、白血球の1種類である単核球は、インテグリンを介してフィブロネクチンと結合することにより活性化されることが報告された(平成4年度日本免疫学会学術集会にて滝澤らが発表)。即ち、白血球の細胞外基質タンパク質へのインテグリンを介した接着は、白血球の遊走に必須であるだけでなく遊走した白血球の活性化にも関与していることになる。

【0008】発明者らは、このような白血球の遊走及び活性化の阻害物質として白血球の細胞外基質タンパク質へのインテグリンを介した細胞接着を抑制する物質が適当であると考えて鋭意研究を重ねた結果、特定のペプチドがこの細胞接着を阻害し、抗炎症剤としても有効であることを見出して、本研究を完成するに至った。即ち、本発明は、下記一般式(1)：

はその薬学的に許容される塩を有効成分として含有する、細胞接着阻害剤を提供する。また、本発明は、上記細胞接着阻害剤を有効成分として含有する抗炎症剤を提供する。

【0009】上記一般式(1)中のAは、アミノ基を有する天然型L体アミノ酸ではなく、上記のようなL体アミノ酸の中でも2級のイミノ基を有するもの(ここでは、プロリン、3, 4-デヒドロプロリン及びサルコシン)、生体内に存在する有機カルボン酸またはその簡単な類縁体である化合物(ピログルタミン酸、L-2-アゼチジンカルボン酸)及びカルボキシル基を有するビタミンまたはビタミン様作用物質(オロチン酸及びハイドロオロチン酸)である。上記一般式(1)中のAが、上記

のようなアミノ基を有する天然型L体アミノ酸以外の生体内アミノ酸、または生体内有機カルボン酸およびその誘導体が適している理由は以下の通りである。

【0010】(1)体内で分解を受けた際に、非天然型の物質は高毒性の代謝産物を産生する可能性があり、毒性・副作用の点で問題がある。

(2)アミノ末端をオロチン酸等の上記Aとして示した化合物で塞ぐことにより、体内に広範に存在するアミノペプチダーゼによる分解から上記一般式(1)で表されるペプチドを保護することができる。アミノペプチダーゼは、気管などの粘膜上皮、消化管、血液等に存在する酵素である。それ故、上記一般式(1)で表されるペプチドのアミノ末端を保護することにより、経口投与(胃を経由し小腸内で吸収)や気管、鼻粘膜、舌下等の粘膜上皮からの投与の際に吸収効率を大幅に向上させると共に、血液中での分解率の低下に起因する体内保持時間の向上を可能にする。

【0011】(3)上記Aとして示した化合物をペプチドの末端に導入すると、従来から知られている単純なペプチド性の化合物であるArg-Gly-Asp-Ser-OHに比べ、細胞接着阻害および抗炎症作用という点で大きな活性の上昇がみられた。また上記Aとして示した化合物を末端に導入することで、各種の細胞外基質タンパク質に対する様々な白血球細胞の接着を阻害するという、広い作用範囲の獲得が可能になった。即ち、上記一般式(1)で表されるペプチドは、様々な種類の細胞外基質タンパク質に対する様々な種類の白血球細胞の接着を阻害するという点で非常に広範な抗炎症作用を示すものである。

【0012】以上のような理由で、上記一般式(1)で表されるペプチドは従来報告されてきたような、単純な構造を持つペプチド性RGD化合物に比べ明らかに抗炎症薬として優れていると考えられる。

【0013】上記一般式(1)で表されるペプチドまたはその薬学的に許容される塩は、強い細胞接着阻害活性を有するだけでなく、フィブロネクチン、コラーゲン、ラミニン、ピトロネクチン等に代表される様々な細胞外基質タンパク質に対する単核球または多形核白血球(好酸球、好中球、好塩基球など)などに代表される各種の白血球細胞の細胞接着を阻害するという幅広い作用スペクトラムを有する。このことは本発明の化合物が様々な種類の白血球の遊走に対して阻害作用を有していることを

示しており、様々なタイプの炎症性疾患に対し炎症抑制作用を発揮することが期待できる。

【0014】また、上記一般式(1)で表されるペプチドまたはその薬学的に許容される塩は白血球表面のフィブロネクチン受容体と基底膜のフィブロネクチンとのインテグリンを介した相互作用を効果的に阻害する作用を有しており、単核球の活性化及び単核球によるインターロイキン1の放出を抑制する作用も期待できる。このように、本発明の化合物は、様々な種類の白血球の遊走を効果的に阻害するだけでなく、単核球の活性化も抑制することが期待でき、両者の相乗的な作用により、広範な炎症性疾患に対し強力な抗炎症作用を発揮するという点で、従来の抗炎症剤に比べより有用性が高い。

【0015】上記一般式(1)で表されるペプチドまたはその薬学的に許容される塩は、分解産物だけでなく分子全体としても非常に安全な化合物である。尚、本明細書において、アミノ酸、ペプチド、その他に関して略号で表示する場合、国際純正および応用化学連合(IUPAC)、国際生化学連合(IUB)の規定或いは該分野における慣用記号に従うものとする。また、遺伝制御に直接関連のある α -アミノ酸に関して光学異性体がありうる場合は、特に明示しなければL体を示すものとする。以下にその例を示す。

【0016】

Arg : アルギニン

Asp : アスパラギン酸

Gly : グリシン

Ser : セリン

Trp : トリプトファン

【0017】上記一般式(1)で表されるペプチドは、市販のアミノ酸を利用して、簡単な操作で容易に合成することができる。すなわち、ペプチド化学において通常用いられる方法、例えば、「ザ ペプチド(The Peptide)」第1巻(Schroder and Lubke著, Academic Press, New York, U.S.A. (1966年))、「ペプチド合成の基礎と実験」(泉屋信夫ら著丸善(株)(1985年))等に記載されている方法によって製造することが可能であり、液相法及び固相法のいずれによっても製造できる。さらに、カラム法、パッチ法のいずれの方法も用いることができる。

【0018】ペプチド結合を形成するための縮合方法として、アジド法、酸クロライド法、酸無水物法、カルボジイミド法、カルボジイミド-アディティブ法、活性エステル法、カルボニルイミダゾール法、酸化還元法、酵素法、ウッドワード試薬Kを用いる方法等を例示することができる。なお、固相法での縮合反応は上記した方法のうち、酸無水物法、カルボジイミド法、及び活性エステル法が主な方法として挙げられる。

【0019】さらに、固相法でペプチド鎖を延長するとき、C末端アミノ酸を用いる有機溶媒に対して不溶な

樹脂等の支持体に結合する。ここでは、アミノ酸を樹脂に結合させる目的で官能基を導入した樹脂や、樹脂と官能基の間にスペーサーを挿入したもの、更に条件によって種々の箇所切断できるハンドル (handle) と称する鎖を導入した樹脂を目的に応じて用いることもできる。このような樹脂としては、例えば、クロロメチル樹脂などのハロメチル樹脂、オキシメチル樹脂、4-(オキシメチル)-フェニルアセトアミドメチル樹脂、4-(オキシメチル)-フェノキシメチル樹脂、C末アミド化用樹脂などを挙げることができる。

【0020】なお、これらの縮合反応を行なう前に、通常公知の手段によって当該縮合反応に関与しないカルボキシル基やアミノ基やアルギニン残基中のグアニジド基等の保護手段を施すことができる。また逆に当該縮合反応に直接関与するカルボキシル基やアミノ基を活性化することもできる。

【0021】保護手段に用いる保護基としては、有機化学の分野において通常用いられている保護基、例えば「プロテクティブ グループス イン オーガニック シンセシス (Protective Groups in Organic Synthesis) (Greene著, John Wiley & Sons, Inc. (1981))」等に記載されている保護基によって保護することが可能である。セリン残基等の水酸基を含むアミノ酸残基中の水酸基の保護基としては、例えばt-ブチル基、ベンジル基、トリメチルシリル基、テトラヒドロピラニル基等を挙げることができる。

【0022】カルボキシル基の保護基としては、例えば、各種のメチルエステル、エチルエステル、ベンジンエステル、p-ニトロベンジンエステル、t-ブチルエステル、シクロヘキシルエステル等の通常公知の保護基を挙げることができる。アミノ基の保護基としては、例えば、ベンジロキシカルボニル基、t-ブトキシカルボニル基、イソボルニルオキシカルボニル基、9-フルオレニルメトキシカルボニル基等を挙げることができる。

【0023】アルギニン残基中のグアニジノ基の保護基としては、例えば、ニトロ基、トシル基、メシチレンスルフォニル基、4-メトキシ-2, 3, 6-トリメチルベンゼンスルフォニル基、2, 2, 5, 7, 8-ペンタメチルクroman-6-スルフォニル基等を挙げることができる。

【0024】カルボキシル基の活性化されたものとしては、例えば、当該カルボキシル基に対応する酸無水物；アジド；ペンタフルオロフェノール、2, 4-ジニトロフェノール、シアノメチルアルコール、p-ニトロフェノール、N-ヒドロキシコハク酸イミド、N-ヒドロキシ-5-ノルボルネン-2, 3ジカルボキシミド、N-ヒドロキシフタルイミド、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール等との活性エステル等を挙げられる。

【0025】アミノ基の活性化されたものとしては、当

該アミノ基に対応する燐酸アミド等を挙げることができる。ペプチド合成の際の縮合反応は、通常溶媒中で行なわれる。当該溶媒としては、例えば、クロロホルム、ジクロロメタン、酢酸エチル、N, N-ジメチルホルムアミド、ジメチルスルホキシド、ピリジン、ジオキサン、テトラヒドロフラン、N-メチルピロリドン、水、メタノール等、又は、これらの混合物を挙げることができる。また、当該縮合反応の反応温度は、通常の場合と同様に、-30℃～50℃の範囲で行なうことができる。

10 【0026】さらに、本発明のペプチド製造工程における保護基の脱離反応の種類は、ペプチド結合に影響を与えずに保護基を離脱させることができる限りにおいて、用いる保護基の種類に応じて選択することができる。例えば、塩化水素、臭化水素、無水フッ化水素、メタンスルホン酸、トリフルオロメタンスルホン酸、トリフルオロ酢酸、又はこれらの混合物等による酸処理、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、ヒドラジン、ジエチルアミン、ピペリジン等によるアルカリ処理；液体アンモニア中におけるナトリウム処理やパラジウム炭素による還元；及び、トリメチルシリルトリフラート、トリメチルシリルプロマイド等のシリル化処理等が挙げられる。なお、上記の酸又はシリル化剤処理による脱保護基反応においては、アニソール、フェノール、クレゾール、チオアニソール、エタンジチオールの如きカチオン補足剤を添加するのが脱保護基反応が効率的に実行されるという点において好ましい。

【0027】なお、固相法で合成したペプチドの固相からの切断方法も通常公知の方法に従う。例えば、上記の酸又はシリル化剤による処理等を当該切断方法として挙

30 げることができる。【0028】このようにして製造された上記一般式(1)で表されるペプチドに対しては、上記の一連の反応の終了後に通常公知の分離、精製手段を駆使することができる。例えば、抽出、分配、再沈殿、再結晶、カラムクロマトグラフィー等によって、より純粋なかたちで本発明ペプチドを収得することができる。

【0029】また、上記一般式(1)で表されるペプチドの塩としては、上記ペプチドの製造工程における反応条件によって得られるものが挙げられ、具体的には塩酸、硫酸、硝酸、リン酸などの無機酸塩類；ギ酸、酢酸、プロピオン酸、グリコール酸、コハク酸、リンゴ酸、酒石酸、クエン酸、トリフルオロ酢酸等の有機酸類；ナトリウム、カリウム、等のアルカリ金属塩；カルシウム塩等のアルカリ土類金属塩類；アンモニウム、エタノールアミン、トリエチルアミン、ジシクロヘシルアミン等の有機アミン類等を挙げることができ、本発明では薬学的に許容される塩を使用する。

【0030】本発明の細胞接着阻害剤および抗炎症剤の投与経路としては、まず注射および点滴による静脈内への投与が挙げられる。この場合には、上記一般式(1)で

表されるペプチドを生理食塩水等の適当な溶液に溶解して、直接注射または点滴薬に混合して使用する方法が考えられる。また、鼻粘膜からの吸収、口内粘膜からの吸収、気管支上皮からの吸収など、粘膜および皮膚からの投与も有効である。この場合は適当な賦形剤や基質を組み合わせて用いることにより、張布剤、舌下錠、エアロゾル製剤等の形態を取ることができる。また、トリプシンインヒビター、アプロチニン、プロマイシン、カモスタット、バシトラシン等の酵素阻害剤や胆汁酸等の化合物と混合して経口投与することも可能である。

【0031】また、本発明の細胞接着阻害剤および抗炎症剤の投与量は、体重1kg当たり0.05~50mgの範囲内であるが、患者の年齢、体重、症状、投与方法により適宜決定する必要がある。また本発明の抗炎症薬は、従来のシクロオキシゲナーゼ阻害薬などの作用機序の異なる抗炎症薬と併用することにより、相乗的な効果が期待できる。この場合、個々の薬剤の使用量をより少量にすることが可能である。

【0032】

【実施例】以下、実施例により本発明をより具体的に説明する。

Pyroglutamic-Arg(Mtr)-Gly-Asp(OBu^t)-Trp-樹脂 (3)

で表される化合物を得た。

【0034】

※

ステップ	試薬又は溶媒	使用量 (ml/step)	時間 (分)	回数
1.	DMF	30	1	6
2.	20% piperidine/DMF	6	2	1
3.	20% piperidine/DMF	6	20	1
4.	DMF	50	1	10
5.	Fmoc-amino-acidと HOBT/DMF(各3当量)	6	2*	1
6.	DIPCD(3当量)**	6	120	1

* : 振盪後除去することなく次のステップへ進む。

** : diisopropylcarbodiimide

【0035】得られた保護ペプチド樹脂を0℃のトリフルオロ酢酸中で、m-クレゾール、エタンジチオール存在下、1M トリメチルシリルプロマイドと1M チオアニソールで1時間処理を行った。窒素気流中でトリメチルシリルプロマイドを留去後、樹脂を濾去し、濾液にジエチルエーテルを氷冷下において加え、樹脂から切断されたペプチドを粉末として得た。そして、当該粉末をジエチルエーテルで洗浄した。当該洗浄物をセファデックスG-10(ファルマシア社製)を支持体としたゲル濾過クロマトグラフィーにより脱塩し、これを凍結乾燥して粗ペ

*明する。しかしながら本実施例によって本発明の範囲が限定されるものではない。また、実施例において使用した化合物は、

化合物1 : Pyroglutamic-Ser-Arg-Gly-Asp-Trp-OH

化合物2 : Orotyl-Ser-Arg-Gly-Asp-Trp-OH

比較例 : Arg-Gly-Asp-Ser-OH

である。尚、化合物1は、下記の製造例1に示す方法で、化合物2は、下記の製造例2に示す方法で合成した。

10 【0033】〔製造例1〕

化合物1 : Pyroglutamic-Ser-Arg-Gly-Asp-Trp-OH の合成

下記式(2) :

$\text{HOCH}_2\text{-Ph(1,4)-OCH}_2\text{-Ph(1,4)-Polymer}$ (2)

で表されるp-alkoxybenzyl alcohol 型(Trpの導入量 : 0.87meq/g; BACHEM社製)樹脂 0.275g(0.25mmol) を反応容器に移し、DMAP存在下、Fmoc-Pyroglutamic (Fmoc : 9-フルオレニルメトキシカルボニル、Pyroglutamic : ピログルタミン酸)を活性エステルで導入後、表1に示す

振盪、濾過ステップを繰り返し、下記式(3) :

Pyroglutamic-Arg(Mtr)-Gly-Asp(OBu^t)-Trp-樹脂 (3)

※【表1】

プチドを得た。この粗ペプチドを高速液体クロマトグラフィー(HPLC) [カラム : ODS 5C₁₈(μbondasphere, φ20×150mm)、移動相 : (A)0.1%TFA, (B)100%CH₃CN/0.1%TFA, gradient : (A):(B)=80:20 から (A):(B)=70:30、20分間、流速 17ml/min] にて精製し、更にセファデックスG-25を支持体とするゲル濾過により酢酸塩として、凍結乾燥することにより表題の化合物1 :

Pyroglutamic-Ser-Arg-Gly-Asp-Trp-OH

を100mg 得た。

50 【0036】アミノ酸分析(6N HCl+phenol, 24hr, 110

℃)

本検出法ではトリプトファンは酸加水分解中に分解されるために検出できない。また、定量的ために外部標準として用いたアミノ酸は標準アミノ酸であるために、標準アミノ酸に含まれていないアミノ酸に関しても検出できない。

Asp 0.86 (1)
Ser 1.00 (1)
Glu 1.12 (1)
Gly 1.22 (1)
Trp - (1)
Arg 1.13 (1)

【0037】HPLC分析

Cosmosil 5C18-AR (φ4.6 × 200mm)カラム (ナカライテスク社製)を用い、流速 1.0ml/minで、0.1%TFA中アセトニトリル10~40%(60分)のgradient溶出での分析HPLCで保持時間14.0分の単一ピークを示した。

FAB-MS : M+H 計算値731.3、実測値731

【0038】〔製造例2〕

化合物2 : Orotyl-Ser-Arg-Gly-Asp-Trp-OH の合成

製造例1と同様の方法によって、表題のペプチドを100mg合成した。

アミノ酸分析(6N HCl+phenol, 24hr, 110℃)

Asp 0.86 (1)
Ser 1.00 (1)
Gly 1.26 (1)
Trp - (1)
Arg 1.00 (1)

HPLC分析

Cosmosil 5C18-AR (φ4.6 × 200mm)カラム (ナカライテスク社製)を用い、流速 1.0ml/minで、0.1%TFA中アセトニトリル10~40%(60分)のgradient溶出での分析HPLCで保持時間20.0分の単一ピークを示した。

FAB-MS : M+H 計算値758.3、実測値758

【0039】〔実施例1〕

白血球の細胞外基質タンパク質への接着実験

細胞外質蛋白質としては、1型コラーゲン (岩城ガラス、type1-c) およびフィブロネクチン (ヒト由来、岩城ガラス)を用い、これらの細胞外基質タンパク質を吸着させたプラスチックプレートに対する細胞の接着を調べる実験を行った。

【0040】(細胞外基質タンパク質吸着プレートの作成) コラーゲンは、塩酸でpH3.0に調節した生理食塩水で希釈し、100μg/mlに調製した希釈溶液を吸着に使用した。一方、フィブロネクチンはpH7.4のリン酸緩衝液含有生理食塩水 (以下、PBSと略す。) で希釈し、20μg/mlに調製し使用した。

【0041】例えば、1型コラーゲン吸着プレートを作成する際には、1型コラーゲンの希釈溶液を0.4mlずつ24穴のプラスチックプレートに入れ、37度で一晩保温し

1型コラーゲンをプレートに吸着させた。さらに非特異的な細胞の吸着を防ぐ目的で3%牛血清アルブミン (シグマ社)を含むPBSを各穴に入れ、37℃で1~2時間処理した。最後にPBSで3回洗浄し1型コラーゲン吸着プレートとした。フィブロネクチンについても全く同様の方法で吸着プレートを作成した。

【0042】(細胞接着阻害活性の測定) ヒト前腕部静脈よりヘパリン採血にて採取した血液を、Ficoll-Hypaque混合溶液 (比重=1.114)を用いて遠心分離処理 (300g, 30分)を行い、好中球の分画を分離採取した。当該好中球分画をリン酸緩衝生理食塩水で2回洗浄し、実験に使用した。この好中球分画を上記の2種類のコートプレートに一定量入れ、化合物1、2または比較例の化合物の存在下で、それぞれ30分間インキュベーション (37℃, 5%CO₂+95%O₂)を行った。30分後に生理食塩水で各プレートを洗浄し、未接着細胞を除去後、メチレンブルーで細胞を染色し接着細胞数の指標とした。

【0043】図1は、プレートに固相化したフィブロネクチンに対する好中球の接着及び各化合物の接着阻害活性について調べた実験結果である。本発明の化合物1及び2は比較例に比べより低濃度で好中球の接着を抑制した。図2は、プレートに固相化したコラーゲンに対する好中球の接着及び各化合物の接着阻害活性について調べた実験結果である。比較例の化合物は、コラーゲンへの好中球の接着に対しあまり強い抑制作用を示さなかったが、これらに比べ本発明の化合物は、より低濃度で好中球の接着を抑制した。

【0044】このように、上記一般式(1)で表されるペプチドはフィブロネクチンだけではなく様々な細胞外基質タンパク質への好中球の接着を非常に低い濃度で効果的に抑制した。このことは、実際にはフィブロネクチン、数種類の異なるタイプのコラーゲン、ヒトロネクチン、ラミニン等非常に多くの細胞外基質タンパク質からなる基底膜と白血球との複雑な相互作用に対し、本発明の化合物が幅広い抑制作用を有していることを示しており、作用スペクトラムの広いより有効な抗炎症剤となり得ることを示している。

【0045】〔実施例2〕上記一般式(1)で表されるペプチドを生理食塩水に溶解し、マウスに200mg/kgの割合で静脈内投与を行ったが、毒性は全く観察されなかった。

【0046】

【発明の効果】本発明の細胞接着阻害剤および当該阻害剤を有効成分として含有する抗炎症剤は、極めて低毒性であることを特徴としており、また様々な白血球細胞の関与する幅広い炎症性疾患に対する治療を可能にするという点で、産業上極めて有用である。

【図面の簡単な説明】

【図1】実施例1における、固相化したフィブロネクチンへの好中球の接着に対する抑制作用を示す図である。

【図2】実施例1における、固相化したコラーゲンへの

好中球の接着に対する抑制作用を示す図である。

【図1】

【図2】

図1 フィブロネクチンに対する好中球の付着

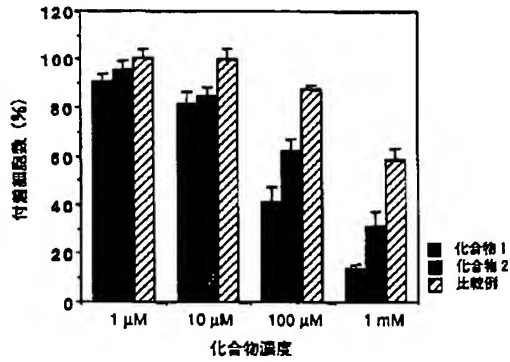
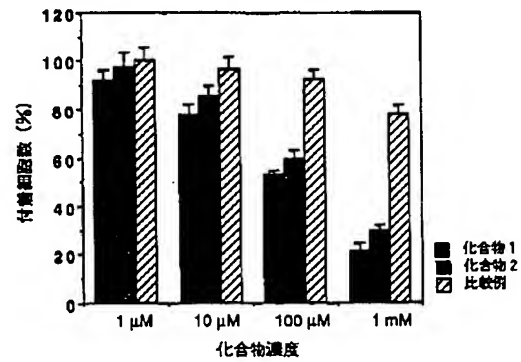


図2 コラーゲンに対する好中球の付着



フロントページの続き

(72)発明者 佐藤 吉美

神奈川県川崎市中原区井田1618 新日本製
鐵株式会社先端技術研究所ライフサイエ
ンス研究センター内